

2. Material & Methoden

2.1. Chemikalien

2.1.1. Testsubstanzen

3, 3', 4, 4',5 – Pentachlorbiphenyl (PCB 126) wurde von der Firma Promochem GmbH, Wesel, bezogen. Die Reinheit betrug > 99%.

2, 3, 7, 8 – Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) wurde von der Firma Ökometrik, Bayreuth, bezogen. Die Reinheit betrug 99,4%.

Die Testsubstanzen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO pro analysi, Merck) gelöst.

2.1.2. Pufferlösungen und Kulturmedium

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS), fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS), Hank's balanced salt solution (HBSS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und RPMI 1640 wurden von der Firma Biochrom, Berlin, bezogen.

2.2. Thymusepithelzellkulturen

2.2.1. Thymusepithel vom Menschen

Teile des großen juvenilen Thymus werden im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe zur Korrektur von angeborenen Herzfehlern entfernt und üblicherweise verworfen. Dieses Gewebe wurde uns freundlicherweise vom Deutschen Herzzentrum Berlin überlassen und diente uns zur Etablierung der Primärkulturen. Verfahren wurde hierbei nach der Arbeitsvorschrift zur Präparation von Gewebe zur Kultivierung von Thymusepithel (siehe 2.2.3.). Die Kulturflaschen wurden im Zellkulturschrank bei 37° C in Raumluft unter Zugabe von 5 vol. % CO₂ bebrütet. Die Zellkulturen wurden passagiert, sobald ein konfluenter Zellrasen vorhanden war (nach 5 bis 8 Tagen). Es wurden ausschließlich Kulturen zwischen der dritten und der sechsten Passage verwendet. Dieses entspricht einer maximalen Kulturdauer von 20 bis 45 Tagen. Beispiele für das Aussehen von Thymusepithelzellen als Monolayerkultur zeigt Abbildung 2.1..

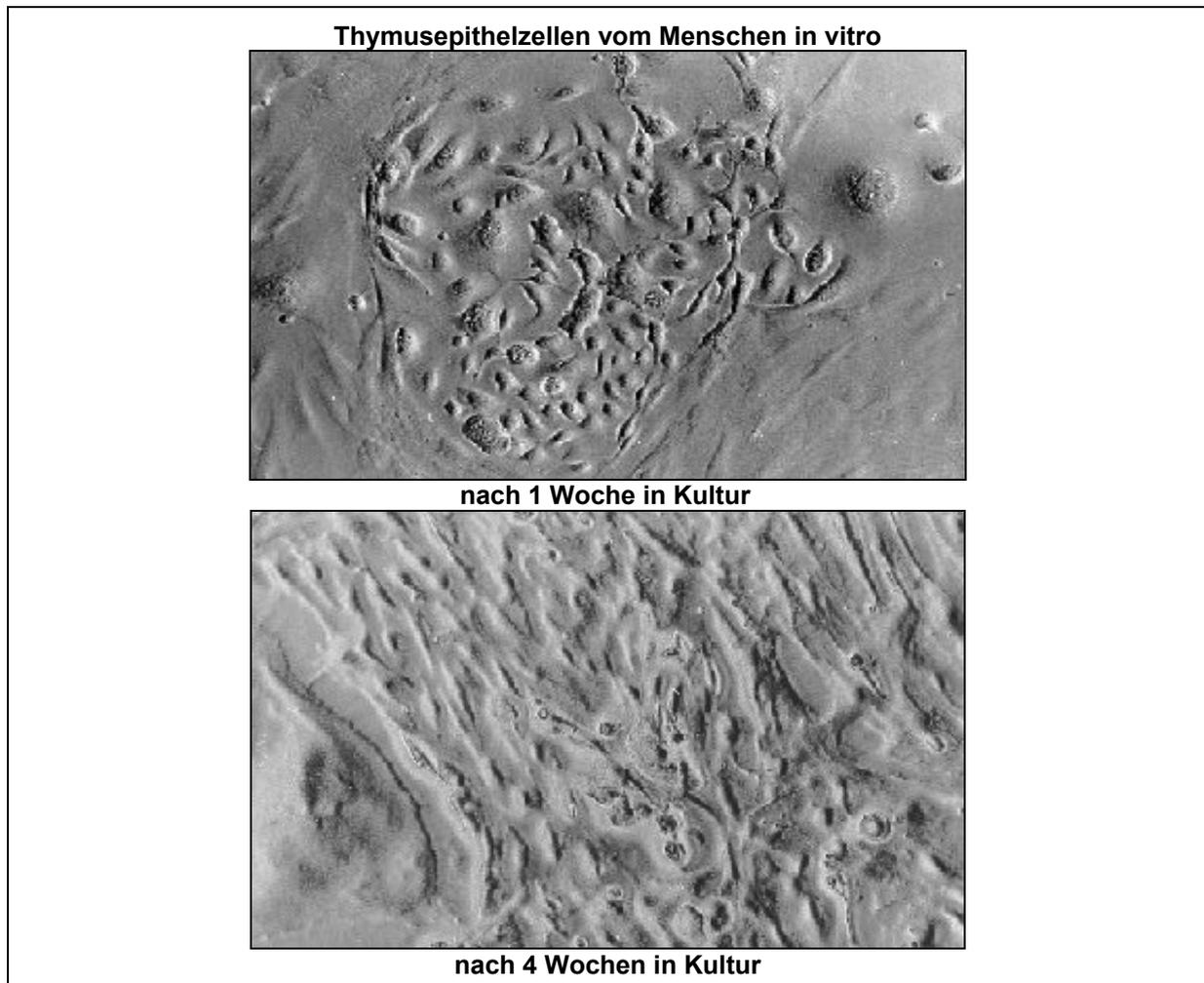


Abbildung 2.1.: Thymusepithelzellkulturen vom Menschen nativ nach einer Kulturdauer von einer und vier Wochen. Erkennbar ist das kopfsteinpflasterartige Aussehen der jüngeren Kulturen. Die Zellen älterer Kulturen neigen dazu, sich zu bipolaren Zellen zu strecken.

2.2.3. Kulturmedium

Bei dem benutzten Kulturmedium für die gesamten Kulturen handelt es sich um eine Zusammenstellung von 80 % Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und 20 % fetales Kälberserum (FCS) mit folgenden Zusätzen: L-Glutamin 4 mM (Biochrom, Berlin), epidermaler Wachstumsfaktor 12 ng/ml (Gibco Gaithersburg, USA), Hydrocortison 0,4 µg/ml (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) und Na⁺-Pyruvat 1 mM (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen).

Weder Antibiotika noch Antimykotika wurden dem Medium zugesetzt.

2.2.4. Arbeitsvorschrift: Präparation von Gewebe zur Kultivierung von Thymusepithel

1. *Kapsel entfernen*: Die Kapsel des Thymus wird mit zwei Pinzetten gefaßt und durch Reißen entfernt. Hierbei löst sich die Kapsel in Lappen. Auf diese Weise wird weiter verfahren, bis die komplette Kapsel entfernt ist. Das Thymusgewebe sieht dann nicht mehr glatt / glänzend, sondern stumpf / matt aus.
2. *Thymus zerkleinern*: Der Thymus wird in einen Glasmörser überführt. Mit einer gebogenen Schere wird das Gewebe – unter kontinuierlicher Mischung der Fragmente – zunehmend klein geschnitten. Dieses wird solange fortgeführt, bis ein homogener Brei entstanden ist und makroskopisch keine Gewebestücke mehr erkennbar sind. Die Fragmente haben dann eine Größe von ungefähr 1 mm^3 . Da der Gewebebrei gelegentlich sehr klebrig ist, kann er durch tropfenweise Zugabe von PBS (Fa. Biochrom, Berlin) verdünnt werden.
3. *Lymphozyten auswaschen*: Der entstandene Thymusbrei wird in einen 100 ml Meßkolben überführt. Es werden 40 ml PBS aufgegossen. Durch vorsichtiges Schütteln wird der Thymusbrei suspendiert. Anschließend 5 Minuten sedimentieren lassen, bis die Fragmente zu Boden gesunken sind, danach die trübe, lymphozytenhaltige Flüssigkeit dekantieren, dabei möglichst wenige Thymusfragmente abgießen. Der Thymusbrei wird weitere zweimal auf diese Weise gewaschen.
4. *Enzymatische Dissoziation*: Dispase Grade II (Boehringer Mannheim, Mannheim) wird mit HBSS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Biochrom, Berlin) gemischt. Dabei werden 10 ml Dispase auf 14 ml HBSS gegeben. Die Dispase wird auf den Thymusbrei in den 100 ml Meßkolben gegossen. Durch vorsichtiges Schütteln ist der Thymusbrei zu resuspendieren und wird dann für insgesamt 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert.
5. *Mechanische Desaggregation*: Der Thymusbrei wird nun in ein 250 ml Becherglas überführt. Mit der Pipette wird der Thymusbrei wiederholt aspiriert und wieder ausgeworfen. Dadurch werden die Epithelzellen aus dem Thymus gelöst.
6. *Waschen*: Der Inhalt des Becherglases wird in Portionen von 10 ml auf drei bis fünf 12 ml Röhrchen (Fa. Greiner) verteilt und bei 250g für 10 min

zentrifugiert. Wenn der Überstand klar ist, wird er dekantiert, ansonsten werden weitere 10 min bei 500g zentrifugiert. Das Sediment wird mit PBS aufgefüllt, die Epithelzellen werden resuspendiert und erneut 10 min bei 250g zentrifugiert. Den Überstand erneut dekantieren.

7. *Kultivieren*: 13 ml Kulturmedium in eine 75 cm² Kulturflasche mit belüftetem Verschluss (Falcon / Becton-Dickinson, Heidelberg) geben. 5 ml aspirieren und damit das Pellet in dem Röhrchen resuspendieren, anschließend zurück in die Kulturflasche pipettieren. Die Kulturflaschen werden danach in den Kulturschrank gegeben.

2.3. Behandlung der Zellkulturen

Die Kulturen wurden entweder mit TCDD bzw. PCB in verschiedenen Konzentrationen behandelt oder mit dem Vehikel (DMSO) allein. Wie aus Abbildung 2.2. hervorgeht, wurde von zwei „Geschwister“-Schalen jeweils eine mit TCDD / PCB, die andere mit dem Vehikel behandelt. Dieses Vorgehen wurde wegen der hohen Variabilität der Primärkulturen gewählt, die sowohl in Abhängigkeit vom Spender als auch in Abhängigkeit von der Kulturdauer beobachtet wurde [Riecke et al., 2000].

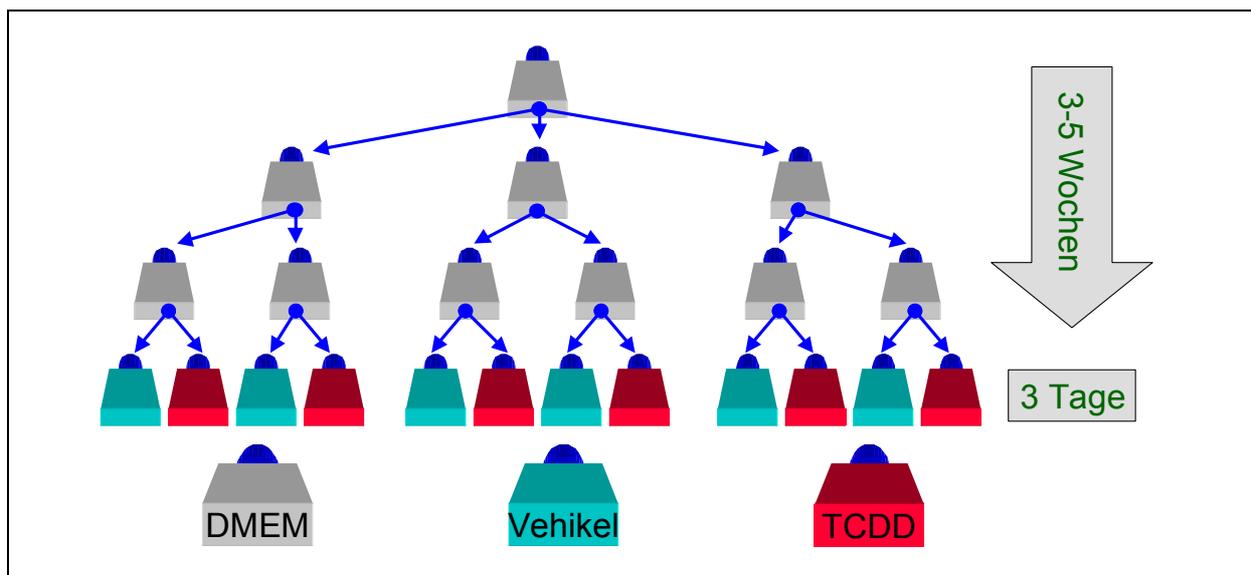


Abbildung 2.2. : Kultur der Thymusepithelien und Versuchsdurchführung

Die maximale DMSO-Konzentration im Medium war 0,1%. Diese Konzentration hatte keine Effekte auf die Thymusepithelzellen, wie ein Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zeigte.

2.3.1 Humanes Thymusepithel

Zunächst wurden Versuche mit einer Konzentration von 10 nM TCDD durchgeführt. Da jedoch noch im picomolaren Bereich eindeutige Veränderungen feststellbar waren, wurde schließlich insgesamt ein Konzentrationsbereich untersucht, der 5 Größenordnungen umfasst. Die Versuche wurden mit TCDD in folgenden Konzentrationen parallel zu entsprechenden Vehikelkontrollen durchgeführt:

	Konzentration	Anzahl der untersuchten Kulturflaschen
1. Serie	10 nM	(n=50)
2. Serie	1 nM	(n=40)
3. Serie	100 pM	(n=30)
4. Serie	10 pM	(n=30)
5. Serie	1 pM	(n=30)
6. Serie (zum Vergleich) PCB126	100 nM	(n=30)

Die Behandlung erfolgte, indem jeweils 10 - 100 µl einer entsprechenden Stammlösung zu 10 ml Kulturmedium gegeben wurde. Die Zellen wurden anschließend für weitere drei Tage mit diesem Medium kultiviert. Nach dieser Zeit wurde das Medium mit gepufferter Kochsalzlösung abgewaschen, die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA (s.o.) aus den Kulturschalen gelöst. Durch kräftiges Pipettieren wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und anschließend durchflußzytometrisch analysiert.

2.4. Zellzählung

Die Zahl der Zellen in jeder Kulturschale wurde mit einem automatischen Zellzählgerät Sysmex F-820 (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt) gemessen.

2.5. Antikörper

Für die durchflußzytometrische Analyse wurden die folgenden Antikörper eingesetzt:

2.5.1. Primäre Antikörper

Verwendet wurden Antikörper gegen Integrine, gegen Adhäsionsmoleküle und gegen Epithelbestandteile.

Monoklonale Antikörper zur Markierung von Integrinen:

Integrin β 3 (CD61), Integrin α 2 (CD49b), Integrin α v (CD51) und Integrin α 5 (CD49e)

Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich

Integrin α 6 (CD49f) Fa. Pharmingen, San Diego, USA

Integrin β 1 (CD29) Fa. Coulter

Monoklonale Antikörper zur Markierung von Adhäsionsmolekülen:

LFA3 (CD58) Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich

ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (CD106) Fa. Pharmingen, San Diego, USA

Monoklonale Antikörper zur Markierung von terminal differenzierten Thymusepithelzellen:

Es wurde der Überstand von TE-8 und TE-16 Hybridomzellklonen (Fa. ATCC, Manassas, VA, USA) verwendet. Die Hybridomzellklone wurden in RPMI 1640-Medium unter Zusatz von FCS 10% und L-Glutamin 4 mM kultiviert. Die Überstände wurden bei -80°C aufbewahrt und vor Nutzung bei Raumtemperatur aufgetaut und bei 4°C aufbewahrt.

Monoklonale Anti-Zytokeratin-Antikörper

AE1 / AE3 – Antikörper Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland.

2.4.2. Sekundäre Antikörper

FITC-konjugierter Anti-Maus IgG-Antikörper und FITC-konjugierter Anti-Maus IgM-Antikörper Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich.

Alle verwendeten Antikörper werden in Tabelle 2.1. zusammengefaßt.

Tabelle 2.1.: Übersicht über die verwendeten Antikörper

CD-Nr.	Hersteller	Klon		Konjugation
CD 29	Coulter	4B4LDC9LDH8	Integrin $\beta 1$	FITC, PE
CD 44	Immunotech	J.173	H-CAM, Pgp-1	FITC
CD 49b	Immunotech	Gi9	VLA2, Integrin $\alpha 2$, Kollagenrezeptor	FITC
CD 49e	Immunotech	SAM1	VLA5, Integrin $\alpha 5$, Fibronektin- und Invasinrezeptor	FITC
CD 49f	Immunotech	GoH3	VLA6, Integrin $\alpha 6$, Lamininrezeptor	FITC
CD 51	Immunotech	AMF7	Integrin αV , Vitronectinrezeptor	FITC
CD 54	Pharmingen	84H10	ICAM-1	PE
CD 58	Immunotech	AICD58	LFA-3; bindet LFA-2 (CD2)	PE
CD 61	Immunotech	SZ21	Integrin $\beta 3$, gp11a	FITC
CD 106	Pharmingen	1G11	VCAM, bindet CD 49d	Keine
	Boehringer	AE1 / AE3	Intrazelluläre epitheliale Zytokeratine	Keine
	ATCC	TE-8	Hassal'sche Körper	Keine
	ATCC	TE-16	Hassal'sche Körper	Keine

2.5. Durchflußzytometrische Analyse der Thymusepithelzellen

Die Voraussetzungen für die Messung der Zellen im Durchflußzytometer ist zum einen das Vorliegen einer monodispersen Zellsuspension und die Markierung der zu untersuchenden Zellepitope mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern. Da die Thymusepithelzellen unter den gewählten Kulturbedingungen einen Zellrasen („monolayer“) bilden und auf dem Boden der Kulturflaschen adhären, ist eine enzymatische Behandlung nötig, um die Epithelzellen vom Boden der Flaschen zu lösen.

Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte (Mengenangaben, Reaktionszeiten) befindet sich in Absatz 2.5.3..

2.5.1. Immunmarkierung membranständiger Antigene

Zuerst wurde das in den Kulturflaschen befindliche Kulturmedium abgesaugt, und zweimal mit PBS gespült. Dabei wurden nicht adhären Zellen entfernt.

Anschließend folgte die enzymatische Behandlung mit Trypsin/EDTA (Fa. Biochrom, Berlin), wodurch der Zellrasen vom Boden der Flasche gelöst wurde. Diese Reaktion wurde nach dem Lösen der Zellen durch Zusatz von Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension gewaschen.

Für die Immunmarkierung wurden die Antikörper in Reagenzgläser aus Polystyren (Falcon 2052, 4 ml, [12 x 75 mm], Becton Dickinson, Heidelberg) pipettiert und mit den Thymusepithelzellen für 30 Minuten inkubiert. Zur Unterbindung von Stoffwechselforgängen und zur Stabilisierung der Rezeptoren auf der Membran wurden die Thymusepithelien mit PBS/0,1 % Natriumazid (NaN_3) versetzt und zentrifugiert. Je nach Art des primären Antikörpers (konjugiert oder unkonjugiert [siehe Absatz 2.5.3.]) wurden die Zellen nochmals mit einem sekundären Antikörper inkubiert und mit Natriumazid gewaschen oder direkt zur Durchflußzytometrie verwendet.

2.5.2. Immunmarkierung intrazellulärer Antigene

Um intrazelluläre Zytokeratine zu markieren, musste der Antikörper (AE1/AE3) durch die Zellmembran gelangen. Um dieses zu erreichen wurden die Zellmembranen der

Thymusepithelzellen permeabilisiert, ohne dass die Zellen dabei wesentlich geschädigt wurden.

Die enzymatische Behandlung der Zellen unterscheidet sich hierbei nicht. Jedoch wurden die Zellen, bevor sie auf den primären Antikörper pipettiert wurden, mit 70 %igem Ethanol mit einer Temperatur von -20°C versetzt und anschließend sofort zentrifugiert. Die weitere Behandlung entsprach wieder der extrazellulären Immunmarkierung.

2.5.3. Arbeitsvorschrift zur Immunmarkierung von Thymusepithelzellen

Die folgenden Angaben beziehen sich auf Zellkulturen in 75 cm^2 – Kulturflaschen.

Enzymatische Vorbehandlung der Kulturen

- Das Kulturmedium und die nicht-adhärenen Zellen wurden aus der Kulturflasche abgesaugt.
- Die noch vorhandenen Mediumreste wurden durch Zugabe von 2×10 ml PBS abgespült.
- 1 ml Trypsin (0,05% in PBS, EDTA 0,02%, temperiert auf 37°C) wurde in die Flasche gegeben. Das Ablösen des Zellrasens wurde durch wiederholtes, vorsichtiges Pipettieren der Enzymlösung gefördert. Dieser Vorgang mußte unter dem Mikroskop aufmerksam beobachtet werden und konnte gegebenenfalls durch kurzes Einstellen der Kulturschalen in den Brutschrank (37°C) beschleunigt werden.
- Sobald eine monodisperse Zellsuspension vorlag (nach ungefähr 1 Minute) wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium gestoppt.
- Die Zellsuspension wurde anschließend bei 300 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert.
- Das Pellet wurde mit 10 ml PBS aufgefüllt und nochmals bei 300g zentrifugiert, der Überstand erneut dekantiert.
- Je nach Anzahl der zu untersuchenden Antikörper wurde das Pellet in 2 bis 2,5 ml PBS resuspendiert.
- Zellen zählen (siehe 2.5.)

Immunmarkierung der Zellen

- Die primären Antikörper (Menge gemäß Tabelle 2.2.) wurden in ein Reagenzglas aus Polystyren (4 ml) gegeben.
- In jedes Röhrchen wurden nun 100 µl Zellsuspension pipettiert.
- Die Zellen wurden für 30 Minuten mit den Antikörpern inkubiert.
- Zu jedem Röhrchen wurde 2 ml PBS/0,1 % NaN₃ gegeben.
- Anschließend für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert.
- Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet resuspendiert.
- Die Proben mit unkonjugierten Antikörpern wurden mit jeweils 10 µl sekundärem Antikörper versetzt (IgG oder IgM).
- Die Zellen wurden für 10 Minuten im Kühlschrank mit den sekundären Antikörpern inkubiert.
- Jedes Röhrchen wurde 2 ml PBS/0,1 % NaN₃ versetzt.
- Anschließend wurde für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert.
- Der Überstand wurde nochmals vorsichtig dekantiert.

Tabelle 2.2.: Antikörpermengen

ANTIKÖRPER	MENGE
CD 44, CD 49b, CD 49e, CD 49f, CD 51, CD 54, CD 58, CD 61, CD 106	5 µl
CD 29	3 µl
AE1 / AE3	7 µl
TE – Antikörper	50 µl
Sekundäre Antikörper	10 µl

2.6. Zytokeratinfärbung

Zytokeratin ist ein für epitheliale Zellen spezifisches intrazelluläres Protein. Zur Erkennung einer eventuellen Verunreinigung der Kulturen mit anderen Zellen, insbesondere mit Fibroblasten, wurde von jeder Kulturschale eine Probe mit einem Zytokeratinantikörper (AE1/AE3) nach Ethanol – Permeabilisierung gefärbt.

2.7. Vitalitätstest

Ein *Vitalitätstest* wurde durch Färbung mit Acridin-Orange (Endkonzentration 1,5 mg/l) und Ethidiumbromid (Endkonzentration 5,0 mg/l) durchgeführt und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop mit einer Neubauer Zählkammer ausgewertet. In diesem Test erscheinen die Kerne vitaler Zellen grün fluoreszierend, diejenigen von toten Zellen fluoreszieren rot/orange.

2.8. Durchflußzytometrische Analyse

2.8.1. Allgemeine Angaben

Die Durchflußzytometrie dient der qualitativen und quantitativen Analyse von fluoreszenzmarkierten Zellsuspensionen. Mit Hilfe dieses Verfahrens besteht die Möglichkeit der exakten Quantifizierung und Diskriminierung von Zellpopulationen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper. Die zu untersuchenden Zellen müssen zuvor und in einer Suspension vereinzelt werden.

Bei einer Durchflußzytometrie passieren einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom den Lichtstrahl eines Lasers (siehe Abb 2.3.).

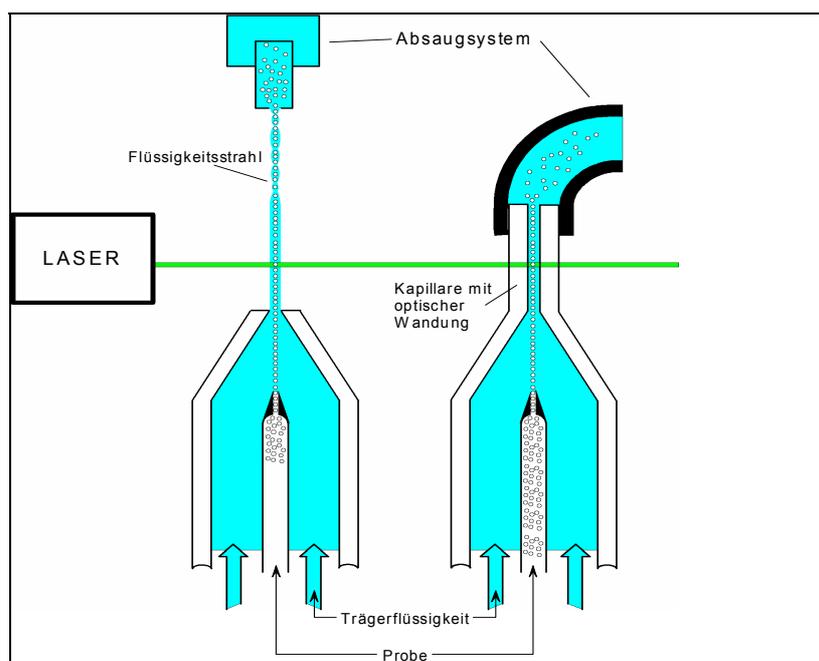


Abbildung 2.3: Durchflußzytometrie – Zählkammer, Probe, Mantelstrom

Tragen diese Zellen fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper (mAK), so emittiert der Fluoreszenzfarbstoff Licht einer bestimmten Wellenlänge (jedes Fluorochrom besitzt ein charakteristisches Emissionsspektrum; Abb. 2.4.), welches von Detektoren aufgenommen wird.

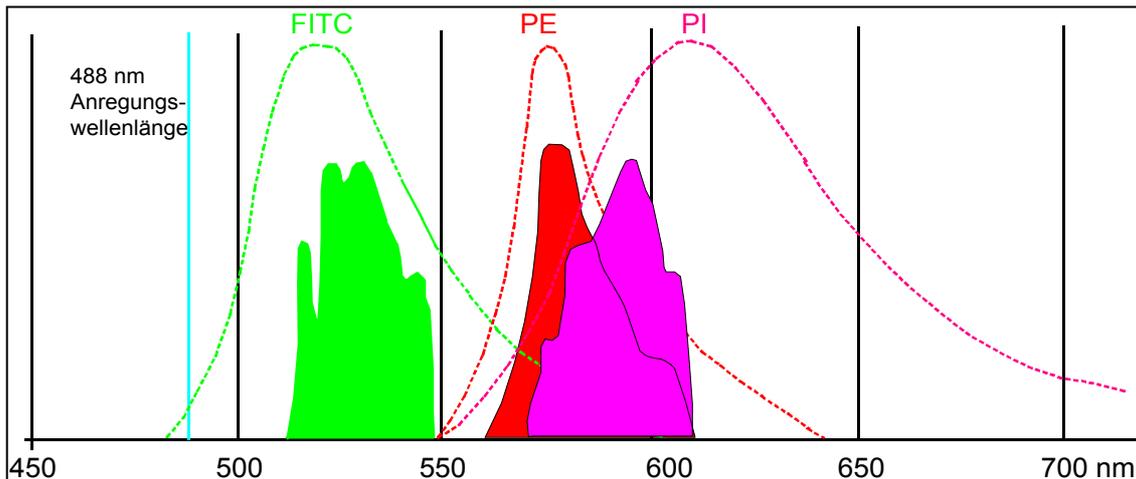


Abbildung 2.4.: Charakteristische Emissionsspektren

Emissionsspektren einzelner Fluorochrome: PE = Phycoerythrin; FITC = Fluoresceinisothiocyanat; PI = Propidiumjodid

In den Detektoren wird durch den Lichteinfall ein elektrischer Impuls erzeugt, dessen Intensität dem Lichteinfall proportional ist. Diese analogen Signale werden in digitale umgewandelt und als Rohdaten gespeichert, um anschließend weiterverarbeitet zu werden.

Werden bestimmte Epitope auf der Zelle mit einem monoklonalen Antikörper markiert, der wiederum mit einem Fluorochrom konjugiert ist, so kann das emittierte Licht zur Charakterisierung der Zellepitope genutzt werden (siehe Abb. 2.5.)

Das entlang der Achse des Laserstrahls gestreute Licht („forward angle light scatter“, FSC) ist der Größe der Partikel, die den Laserstrahl passieren, proportional, und die Messung des im rechten Winkel zum Laserstrahl gestreuten Lichtes („side scatter“, SSC) gibt Informationen über die Granularität der Zellen. Aufgrund dieser Daten lassen sich verschiedene Zellpopulationen in einer Probe unterscheiden (siehe Abb. 2.5.).

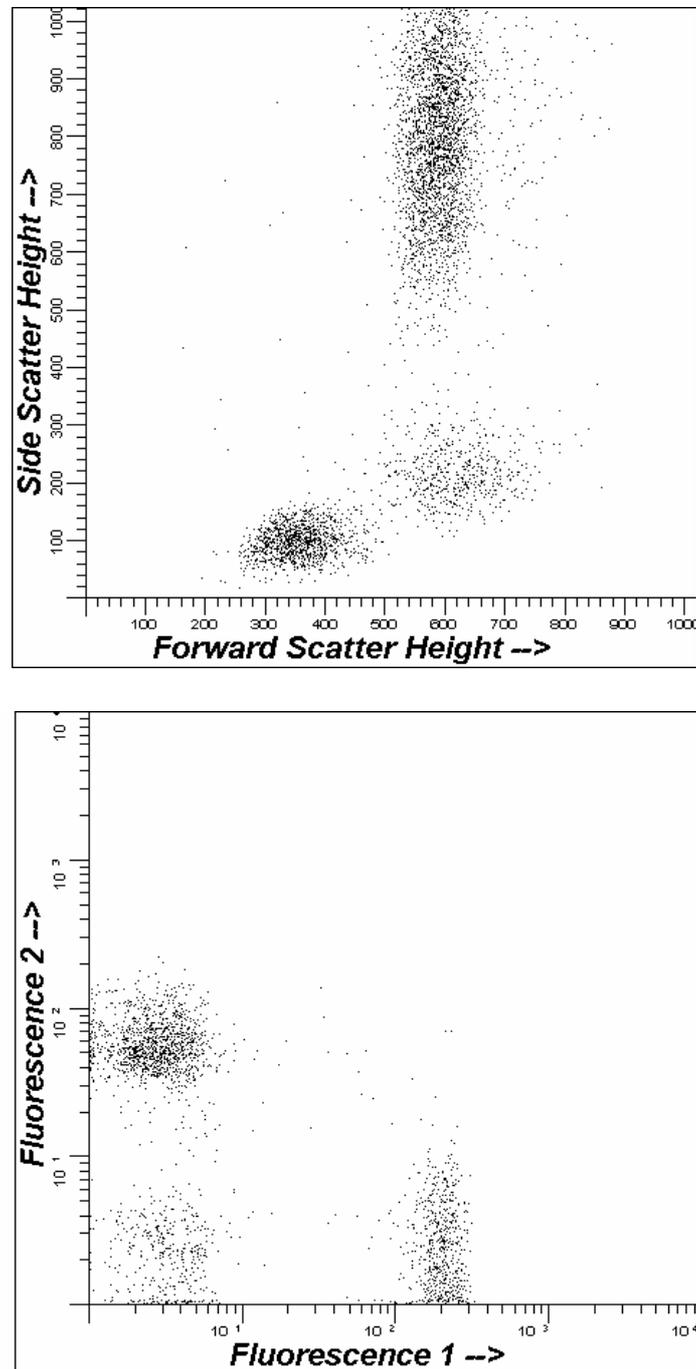


Abbildung 2.5.: Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen anhand der verschiedenen Zelleigenschaften (SSH und FSH) sowie anhand verschiedener Fluoreszenz (Flourescence 1 und Flourescence 2)

2.8.2. Messung

Die Durchflusszytometrie wurde mit einem FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) mit einem 480 nm Argonlaser durchgeführt. Das Gerät wurde mit CaliBRITE Beads (Becton Dickinson, Heidelberg) kalibriert.

Durch entsprechende Wahl des Detektionsfensters wurden sowohl Zelltrümmer als auch Zellaggregate von der Erfassung ausgeschlossen. Es wurden von jeder Probe 5000 Zellen gezählt. Zur Kontrolle der Autofluoreszenz wurden zu jedem Versuch negativ - Kontrollen mitgeführt, die entweder mit FITC - markiertem anti-CD3 oder mit dem sekundären Antikörper behandelt waren.

2.9. Statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden als listmode-Dateien gespeichert und unter Verwendung der Software Winlist 2.0 (Verity Software House, Topsham, USA) analysiert. Es wurde der Anteil der für ein Antigen positiven Zellen anhand der 99 % - Threshold – Method bestimmt (Abb 2.6.). Proben wurden dann als positiv erachtet, wenn mindestens 5 % der untersuchten Zellen über dem Threshold-Wert lagen.

Zur statistischen Auswertung wurde der Wilcoxon-Test als nicht – parametrischer Test für zwei verbundene Stichproben gewählt. P wurde 2 – seitig berechnet. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

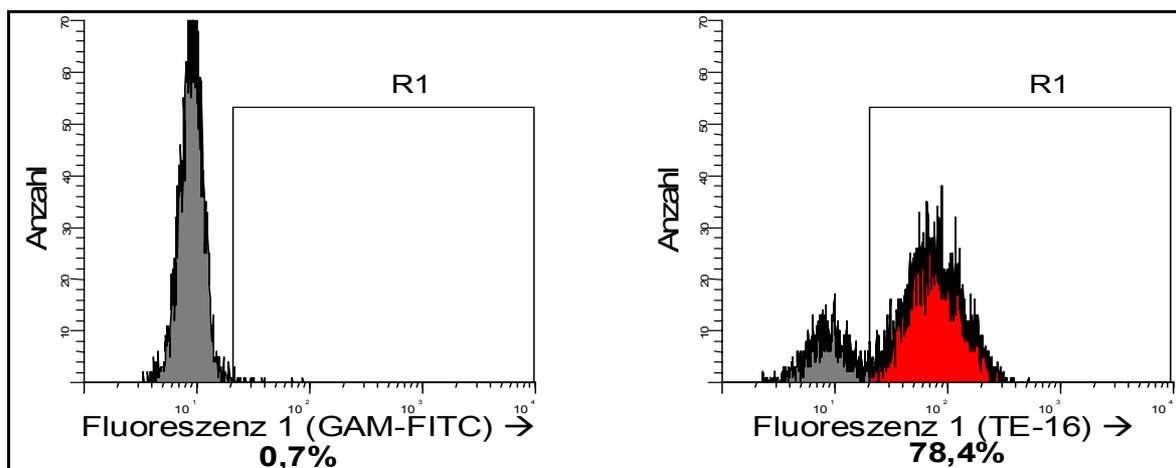


Abbildung 2.6. Auswertung der durchflusszytometrischen Daten nach der 99%-Threshold-Methode. Der „positive Bereich“ (R1) wird so gewählt, dass höchstens 1% der Zellen der Kontrolle in diesen Bereich fallen (hier: 0,7%).

2.10. Mikroskopie

2.10.1. Lichtmikroskopie

Die Zellen wurden vor der Mikroskopie nicht fixiert oder anderweitig behandelt, sondern wurden noch in der Kulturflasche mikroskopiert.

Mikroskopiert wurde mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop.

2.10.2. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Shakibaei vom Institut für Anatomie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Vorbereitung der Thymusepithelzellen für die elektronenmikroskopische Untersuchung

Zunächst wurden die Zellen in 1% Glutaraldehyd plus 1% Tanninsäure in 0,1 M Phosphat-Puffer (pH=7,2) für 60 min. fixiert, 2 x 15 min. in PBS / BSA (1%) gewaschen und 60 min lang in Phosphat-Puffer mit 2% OsO₄ nachfixiert. Die Entwässerung der Präparate erfolgte zuerst in der aufsteigenden Alkoholreihe (je 2 x 15 min. in Ethanol 70%, 90%, 100%) und abschließend in Propylenoxid (2 x 30 min). Danach wurde das Gewebe über Nacht mit einem Gemisch aus Propylenoxid und Epon (1:1) und anschließend über Nacht mit reinem Epon infiltriert. Danach wurden die Präparate 2 Tage lang bei 60°C in Epon eingebettet.

Von den Präparaten wurden Ultradünnschnitte (Dicke 100 nm) angefertigt (Ultracut, Fa. Reichert, Heidelberg, Deutschland), die 15 min. mit einer wässrigen Lösung von Uranylacetat (2%) und 5 min mit einer wässrigen Lösung von Bleicitrat (5%) kontrastiert und unter einem Transmissions-Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10, Zeiss, Oberkochen) untersucht wurden.